重庆中华蜜蜂的形态和遗传多样性

谷 瑛[1]，宾先丽[1]，刘 璐[1]，周 俊[1]，马振刚[1]，
谭宏伟[2]，周泽扬[1]，许金山[1,*]
(1. 重庆师范大学生命科学学院，重庆 401331；2. 重庆市畜牧技术推广总站，重庆 401121)

摘要：【目的】研究地理位置接近的山地区域中华蜜蜂 *Apis cerana cerana* 的形态与遗传多样性，对开展中华蜜蜂遗传资源的保护具有重要意义。重庆多山，如大巴山、武陵山、大娄山等，当地植被茂盛、蜜源植物丰富，适宜中华蜜蜂的生存繁衍。因此，重庆中华蜜蜂是研究同一地域复杂地形下中华蜜蜂形态和遗传分化的良好对象。本研究首次全面调查重庆地区中华蜜蜂种质资源多样性，分析不同生境中华蜜蜂种质资源的分化，考察潜在的基因交流情况，为中华蜜蜂的资源保护提供参考。【方法】运用吻长、翅长、翅宽、翅面积、肘脉指数、第3、4背板长等形态指标对来自重庆不同山脉和周边地区的139群中华蜜蜂进行形态测量和统计，同时对 mtDNA $tRNA^{leu}$ ~ COⅡ段非编码区序列进行PCR扩增并测序分析。【结果】形态分析显示，以亚热带季风气候为主的武陵山、大娄山地区中华蜜蜂能够区分以亚热带山地气候为主的大巴山地区聚群，以及重庆西、北部的聚群。Structure 群体结构分析 mtDNA 非编码区单倍型序列发现，不同山地生境中华蜜蜂种群之间存在基因交流，而两大山系与重庆周边地区中华蜜蜂种群之间同样存在基因交流。此外发现了3个新的东方蜜蜂单倍型，分别是大巴山 CqH4、大娄山 CqH7、西部丘陵 CqH13。【结论】重庆中华蜜蜂不同地理种群形态发生了分化，表现出较强适应性。各山脉和地区中华蜜蜂种群之间遗传结构接近，具有共同遗传单倍型，暗示基因交流发生在不同地理种群中，导致重庆中华蜜蜂的遗传分化不明显。

关键词：中华蜜蜂；地理种群；形态；遗传多样性；单倍型；重庆
中图分类号：Q963 **文献标识码**：A **文章编号**：0454-6296(2016)12-1386-09

Morphological and genetic diversity of the Chinese honeybee, *Apis cerana cerana* (Hymenoptera: Apidae) in Chongqing, southwestern China

GU Ying[1], BIN Xian-Li[1], LIU Lu[1], ZHOU Jun[1], MA Zhen-Gang[1], TAN Hong-Wei[2], ZHOU Ze-Yang[1], XU Jin-Shan[1,*] (1. College of Life Sciences, Chongqing Normal University, Chongqing 401331, China; 2. Chongqing General Station of Animal Husbandry Technology Extension, Chongqing 401121, China)

Abstract: 【Aim】 Chongqing of southwestern China features hills and low mountains in which floral resource plants are abundant. As a consequence, there exists a rich resource of the Chinese honeybee, *Apis cerana cerana* in different geographical regions of Chongqing. Our study comprehensively surveyed the morphological and haplotype diversity of *A. cerana cerana* populations collected from different habitats in different regions of Chongqing, which will contribute to the resource conservation of *A. cerana cerana*. 【Methods】 Samples of one hundred and thirty-nine *A. cerana cerana* populations from different mountainous regions of Chongqing and surrounding areas were collected, and six morphological characteristics of these samples were measured. The fragments of mtDNA $tRNA^{leu}$-COⅡ non-coding region were amplified by PCR and then sequenced to evaluate their genetic diversity. 【Results】 Morphological

基金项目：重庆高校优秀成果转化资助项目(KJZH17113)；重庆市教委科学技术研究项目(KJ1500325)
作者简介：谷瑛，男，1991年10月生，重庆潼南人，硕士研究生，研究方向为蜜蜂基因组学，E-mail：guyinglyy@163.com
* 通讯作者 Corresponding author, E-mail：xujinshan2003@aliyun.com
收稿日期 Received：2016-08-25；接受日期 Accepted：2016-10-20

cluster analysis showed that honeybee populations from Wuling and Ta-lou mountains with subtropical monsoon climate could be distinguished from the honeybee populations from Ta-pa mountains with subtropical mountain climate, and the northern and western regions of Chongqing. The analysis of genetic structure of mtDNA non-coding region showed that gene flow occurred among the honeybee populations from different mountainous habitats. Three new haplotypes of *A. cerana cerana* were identified, *i. e.*, CqH4 from Ta-pa Mountains, CqH7 from Ta-lou Mountains and CqH13 from western hills.【Conclusion】The morphological characteristics of different geographical populations of *A. cerana cerana* in Chongqing show a degree of diversification and are consistent with the geographical distribution. The common haplotypes are usually shared between the *A. cerana cerana* populations from different mountains and regions of Chongqing, suggesting that gene flow occurs and thereby increases the genetic complexity of the Chinese honeybee.

Key words: *Apis cerana cerana*; geographical population; morphology; genetic diversity; haplotype; Chongqing

除了提供蜂产品外,蜜蜂在维持生态系统平衡和促进农作物增产方面起着举足轻重的作用,例如蜜蜂每年为农作物授粉所产生的经济价值高达数百亿元(Sharmah *et al.*, 2015)。中华蜜蜂 *Apis cerana cerana* 简称“中蜂”,属东方蜜蜂 *Apis cerana* 亚种,广泛分布于全国各地,具有悠久的饲养历史(陈盛禄, 2001)。中华蜜蜂可利用零星蜜源植物,采蜜期长,非常适合中国山区定点饲养,但自 20 世纪初西方蜜蜂引入以来,由于西方蜜蜂产蜜量大,中华蜜蜂在与西方蜜蜂的种间竞争中处于弱势,又由于生态环境遭到破坏,中华蜜蜂资源锐减(杨冠煌, 2009),因此保护中华蜜蜂种质资源迫在眉睫。

研究中华蜜蜂资源分化是进行科学保护的前提,目前对蜜蜂资源分化研究方法主要分为形态学方法和分子生物学方法。外部形态是物种遗传最直接的表现形式,利用蜜蜂的形态特征标记可以描述蜜蜂多样性(Ruttner *et al.*, 1978; 李志勇和王志, 2004)。有研究者较为系统地对西方蜜蜂的形态特征进行了鉴定(Ruttner, 1988),目前我国学者对于中华蜜蜂多采用这种形态分析方法。研究发现全国各地区的中华蜜蜂在形态上发生了分化(张连江等, 2006; 王桂芝等, 2008a, 2008b; 罗凌绢和谭垦, 2009; 朱翔杰等, 2009),海拔、经纬度、年均气温等地理和气候因素均对中华蜜蜂分化有着一定的影响(王桂芝和石巍, 2008a, 2008b; 谭垦等, 2005)。在分子水平上对蜜蜂进行遗传分化分析是形态学鉴定的重要补充。mtDNA 标记是蜜蜂遗传聚类的主要分析方法(Smith and Brown, 1988; Garnery *et al.*, 1992, 1993; Smith *et al.*, 2000; Frank *et al.*, 2000),其中 mtDNA $tRNA^{leu}$ ~ COⅡ基因间的一段富含 AT 的非编码区常用来进行遗传变异研究(卜云和郑哲民, 2005)。例如姜玉锁等(2007)利用 mtDNA 对东方蜜蜂进行了分析,发现 11 个地理种群在该段序列有 9 个变异位点,揭示了东方蜜蜂不同地理种群的遗传多样性;Magnus 等(2014)对美国非人工饲养意大利蜜蜂种群 mtDNA 分析发现了 23 个单倍型,证明非人工饲养种群存在着不同的谱系来源。以上方法为我们研究蜜蜂资源分化提供了参考。

重庆位于长江上游,年平均气温 16 ~ 18℃,平均海拔 400 m,最高 2 797 m,山地面积占 70%,有大巴山、巫山、武陵山、大娄山环绕。复杂的山地环境使重庆中华蜜蜂资源丰富(曹联飞等, 2010; 于增源等, 2012; 任勤等, 2012; 谭宏伟等, 2014)。因此,该地区中华蜜蜂是研究复杂地形下蜜蜂形态和遗传分化的良好对象。本研究通过测定形态指标测定,分析 mtDNA 非编码区遗传变异与群体遗传结构,对重庆不同山脉及不同地点的中华蜜蜂资源多样性进行了调查,为中华蜜蜂资源保护提供了参考。

1 材料与方法

1.1 采样

本研究共采集 139 群中华蜜蜂样本,主要为老桶养殖或野生招募,并避免在有引种和商业育王的区域采样。样本采集地信息见表 1,其中重庆共采集不同山脉和地区 122 群,另外采集湖北荆门大洪山 10 群,四川乐山峨眉山 6 群,阿坝马尔康 1 群作为比较。每群蜜蜂采集工蜂 50 头左右,浸泡于 95% 乙醇中保存。

1.2 形态指标测定

每群蜜蜂选取 5 头工蜂,按照《中国畜禽遗传资源志(蜜蜂志)》所要求测定的指标内容及以往相

表 1 中华蜜蜂不同地理种群采集信息

Table 1 Sampling data of different geographical populations of *Apis cerana cerana*

山脉/地区 Mountains/Regions		采样地点 Sampling locality	采样群数 Number of colonies sampled	经度 Longitude	纬度 Latitude	海拔(m) Altitude
重庆 Chongqing	武陵山 Wuling Mountains	武隆 Wulong (WL)	10	107°45′E	29°19′N	502
		秀山 Xiushan (XS)	5	108°59′E	28°27′N	563
		酉阳 Youyang (YC)	2	108°45′E	28°50′N	647
	大娄山 Ta-lou Mountains	南川 Nanchuan (NC)	39	107°05′E	29°09′N	1 065
		綦江 Qijiang (QJ)	10	106°40′E	28°52′N	324
	大巴山 Ta-pa Mountains	城口 Chengkou (CK)	10	108°39′E	31°56′N	877
	西、北部地区 Northern and western regions	大足 Dazu (DZ)	7	105°44′E	29°39′N	407
		合川 Hechuan (HC)	5	106°16′E	29°58′N	242
		江津 Jiangjin (JJ)	9	106°15′E	29°17′N	850
		开县 Kaixian (KX)	11	108°23′E	31°09′N	807
		潼南 Tongnan (TN)	1	105°48′E	30°08′N	436
		万州 Wanzhou(WZ)	3	108°24′E	30°48′N	851
		永川 Yongchuan(YC)	10	105°55′E	29°21′N	460
湖北 Hubei	大洪山 Dahong Mountains	荆门 Jingmen (JM)	10	112°11′E	31°02′N	204
四川 Sichuan	峨眉山 Mount Emei	乐山 Leshan (LS)	6	103°26′E	29°34′N	415
		阿坝 Aba(ABa)	1	101°42′E	32°54′N	2 600

* 括号内缩写为种群代码 Abbreviations in brackets are population codes.

关研究(国家畜禽遗传资源委员会, 2011; 余林生等, 2012; 田柳青等, 2013),分别测定每头蜜蜂的吻长、右前翅长、宽和面积、肘脉指数、第 3 + 4 背板长 6 个指标。

1.3 mtDNA 遗传多样性分析

采用动物基因组 DNA 快速抽提试剂盒(上海生工)提取中华蜜蜂总 DNA,保存于 −20℃ 备用。用 mtDNA $tRNA^{leu}$ ~ COⅡ段公开引物 E2:5′-GGCAGAATAAGTGCATTG-3′;H2: 5′-CAATATCATTGATGACC-3′(Garnery *et al.*, 1992)进行 PCR 扩增, PCR 体系: 上、下游引物各 1 μL(10 pmol/L), dNTP Mixture 4 μL(2.5 mmol/L), Taq 酶 0.25 μL(5 units/μL), DNA 模板 2 μL(100 ng/μL), ddH_2O 36.75 μL, 10 × PCR buffer(Mg^{2+}) 5 μL。PCR 反应程序:95℃ 5 min 预变性; 94℃ 45 s 变性,50℃ 45 s 退火,72℃ 1 min 延伸,共 35 个循环;之后 72℃ 延伸 5 min,胶回收后进行双向测序。

1.4 数据分析和统计

采用 SPSS 21 软件对形态数据进行显著性分析、因子分析、主成分分析、判别分析以及聚类分析(Brannelly *et al.*, 2015)。形态指标数据采用 R 3.13 作散点图(Chambers, 2008)。DNA 测序结果利用 Mega 6 进行多重序列对比(Tamura *et al.*, 2013), DnaSP 5 进行单倍型分析(Librado and Rozas, 2009), Arlequin 3.5 进行分子方差分析(Excoffier and Lischer, 2010), Network 5 绘制网络中介图(Bandelt *et al.*, 1999)。在 NCBI 上下载已公布的东方蜜蜂 mtDNA 非编码区单倍型,利用 DNAMAN 8 进行单倍型序列比对,使用 Structure 2.3.4 进行群体结构分析(Pritchard *et al.*, 2000)。

2 结果

2.1 重庆中华蜜蜂不同种群的形态测定

采集的 139 群中华蜜蜂的吻长(Pr)、右前翅长(FL)、右前翅宽(FB)、右前翅面积(AW)、第 3 + 4 背板长(T3 + 4)、肘脉指数(Ci)形态指标两两之间的线性关系如图 1 所示。通过显著性差异水平分析,表明来自重庆武陵山、大娄山、大巴山和其西、北部的中华蜜蜂在吻长、翅长、翅宽、翅面积、第 3 + 4 背板长的平均值均大于来自大洪山(湖北荆门)和峨眉山(四川乐山)的中华蜜蜂。其中大巴山(重庆城口)中华蜜蜂的形态指标优势明显,接近于采集自阿坝马尔康的中华蜜蜂。

2.2 重庆中华蜜蜂种群间形态指标判别分析

利用逐步判别分析的 Wilk' Lambd 值对 6 项指标进行分类,绘制判别函数散点图。根据判别质心将不同地理中华蜜蜂种群进行聚类,判断不同地理种群中华蜜蜂的形态距离。结果如图 2 所示,来自于重庆武陵山和大娄山以及西、北部的中华蜜蜂聚为一个整体群,而来自于重庆大巴山的中华蜜蜂与上述整体群较远。阿坝马尔康种群与其他中华蜜蜂

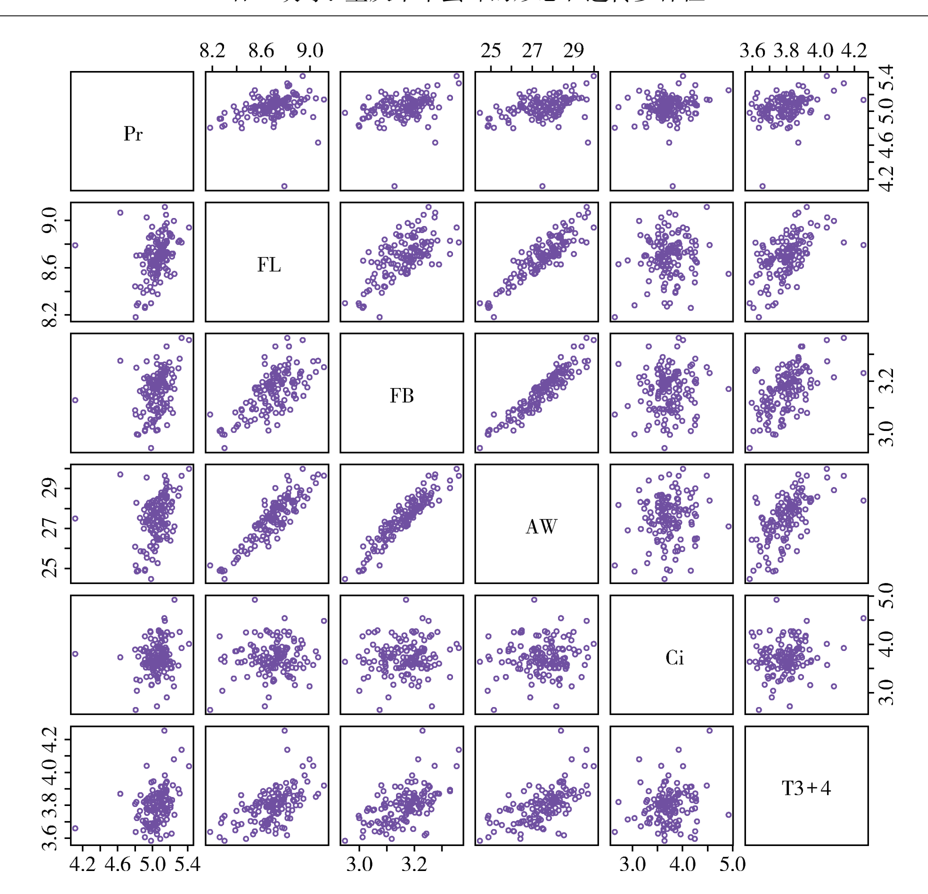


图 1 重庆中华蜜蜂不同种群间 6 项形态指标矩阵散点分布情况

Fig. 1 The matrix scatters of six morphological indexes of *Apis cerana cerana* populations in Chongqing

Pr：吻长 Length of proboscis；FL：右前翅长 Length of right forewing；FB：右前翅宽 Width of right forewing；AW：右前翅面积 Area of right forewing；T3 +4：第 3 +4 背板长 Length of tergum 3 +4；Ci：肘脉指数 Cubital index.

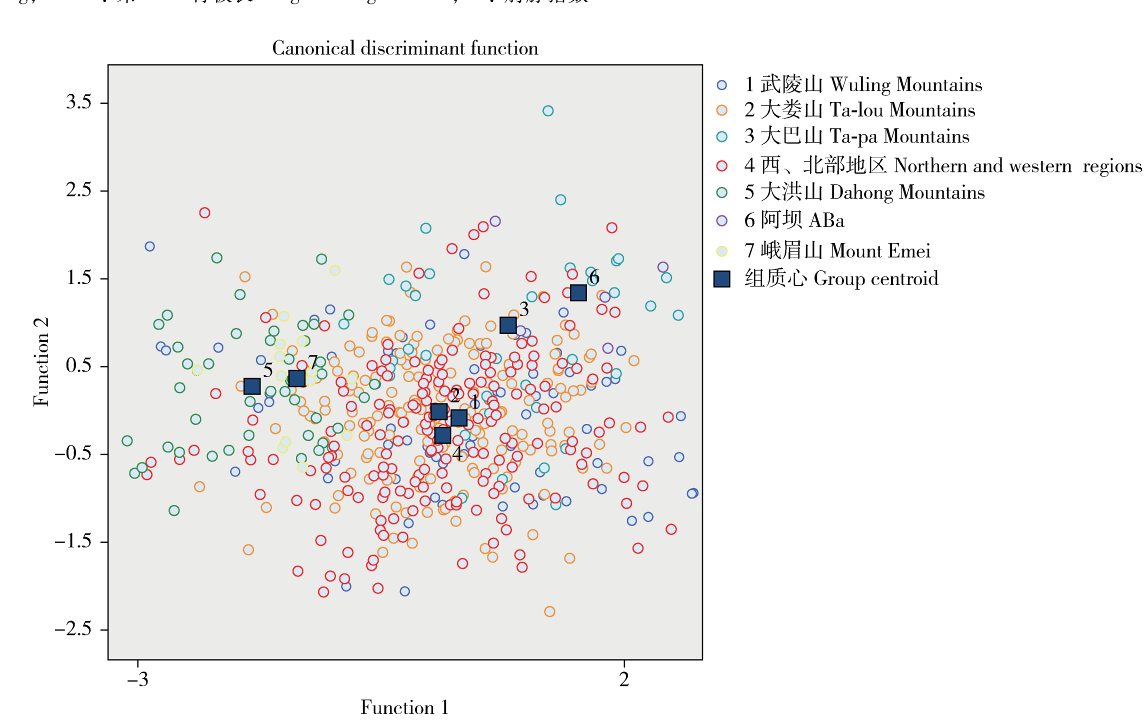


图 2 重庆中华蜜蜂不同种群间 6 个形态指标判别分析

Fig. 2 Discriminant analysis of six morphological indexes of *Apis cerana cerana* populations in Chongqing

每个圆圈代表来自某山脉或地区的一个种群，圆圈颜色代表不同山脉或地区；蓝色方框代表每组质心。Colorful circles represent the honeybee populations derived from different geographical regions. Blue square represents centroid of each group.

表现出明显差异，但与大巴山距离相对较近。大洪山（湖北荆门）与峨眉山（四川乐山）中华蜜蜂距离较近，而与其他地区较远。

2.3 重庆中华蜜蜂种群间形态指标聚类分析

进一步利用平方欧式距离法对形态指标进行直接聚类（图 3）。结果显示，来自于重庆不同山脉和地区的中华蜜蜂与大洪山、峨眉山的中华蜜蜂明显分化为两支，与判别分析结果相一致；而重庆中蜂主要分为三大支，第 1 支是武陵山、大娄山聚群，主要有武隆、南川等；第 2 支是大巴山聚群，主要以城口为代表；第 3 支是以合川为代表的西、北部聚群。这表明中华蜜蜂在不同地理条件下形态出现了分化。来自于武陵山和大娄山的中华蜜蜂聚群较近，这与武陵山和大娄山均属于亚热带季风气候的地理环境相关。

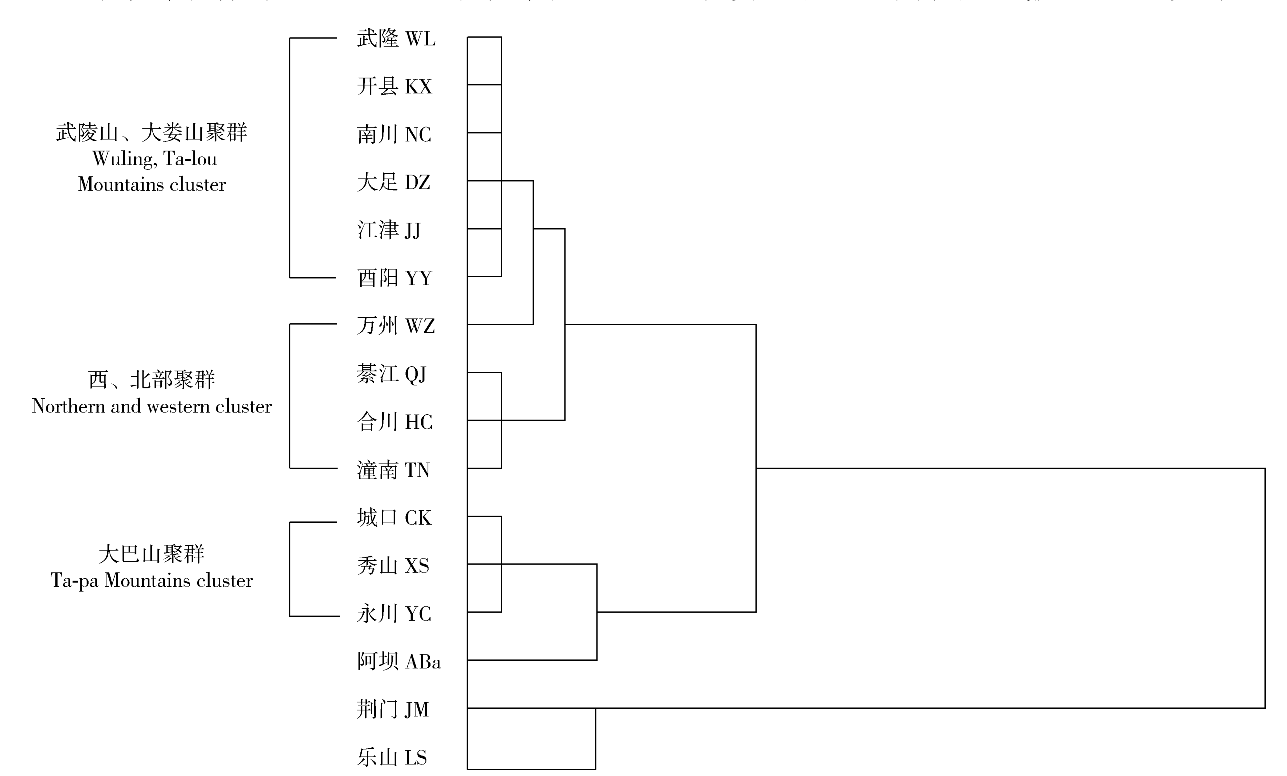


图 3 基于 6 个形态指标的中华蜜蜂不同地理种群形态聚类

Fig. 3 The clusters of different geographical populations of *Apis cerana cerana* based on six morphological indexes

种群代码同表 1。Population codes same as Table 1.

2.4 mtDNA 非编码区的碱基组成及变异情况

测序获得了 139 群中华蜜蜂 mtDNA $tRNA^{leu}$ ~ COⅡ段的部分序列，其中非编码区序列大小为 97 bp，A + T 含量为 87.29%，是一段 A + T 富集区。对 mtDNA 非编码区核苷酸多样度进行分析，结果显示重庆中华蜜蜂的平均核苷酸差异数（K）为 1.7021，核苷酸多样度（Pi）为 0.01792。中华蜜蜂平均核苷酸差异数和核苷酸多样度分别与突变位点呈正比。

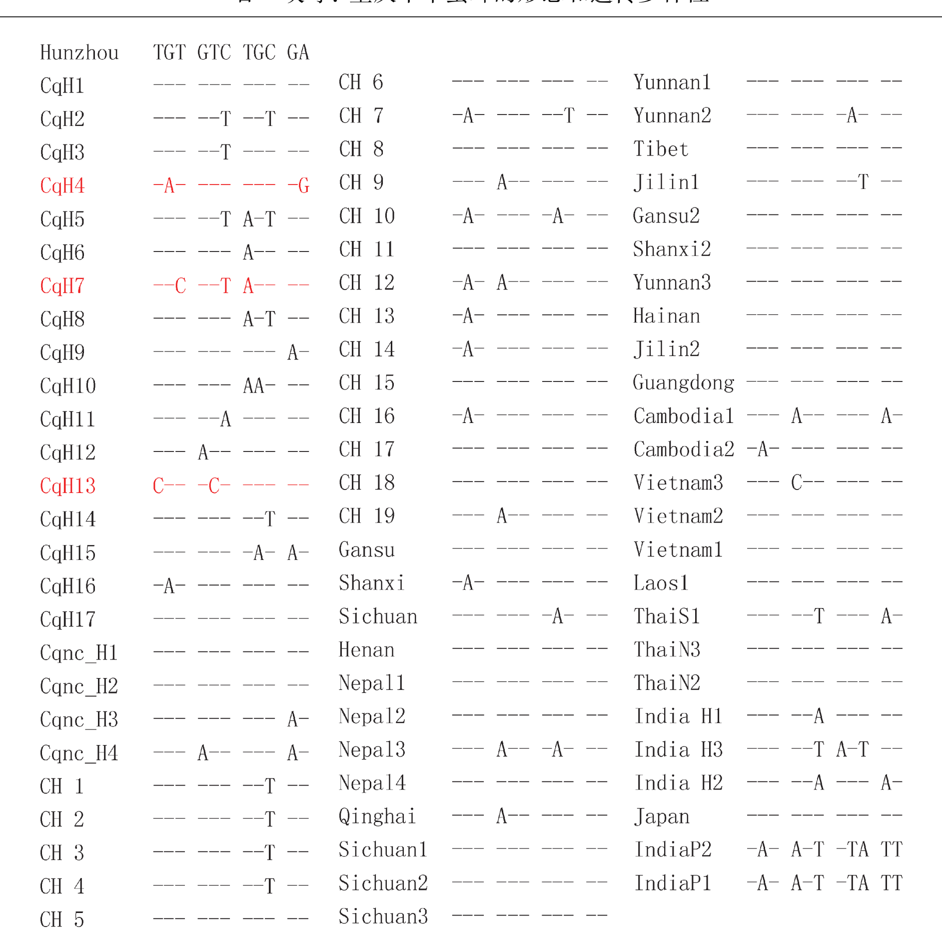
分析中华蜜蜂 mtDNA 非编码区序列，共发现了 17 个单倍型。与从 NCBI 上下载的东方蜜蜂 mtDNA 非编码区单倍型进行对比，发现了 3 个新的单倍型（图 4），分别命名为 CqH4 型（大巴山）、CqH7 型（大娄山）、CqH13 型（西部丘陵）。

2.5 mtDNA 非编码区的单倍型网络中介分析

将获得的 mtDNA 非编码区单倍型变异位点绘制网络中介图，结果显示 CqH1，CqH3 和 CqH5 为 3 个主体单倍型单倍型，CqH1 和 CqH5 出现的频率最高，包含的地区最丰富，为主要的共有单倍型（图 5）。其中有 10 个单倍型起源于 CqH1，1 个单倍型起源于 CqH5，CqH7 与其他单倍型表现出分离。比较来自重庆不同山脉和地区的与大洪山、阿坝马尔康以及峨眉山的中蜂单倍型时发现，它们之间存在共有单倍型，并没有出现分离。

2.6 mtDNA 非编码区群体结构分析

基于形态指标聚类结果将样本划分为 5 个地理聚群，对测序获得的线粒体序列进行群体结构分析。结果如图 6 所示，将等位基因组分数矩阵种群数量（K）设置为 2，3 和 4 时，所调查的 5 个中华蜜蜂聚群的遗传结构整体差异性均不明显，表明来自重庆不同山脉和地区的中蜂种群之间以及与大洪山和峨



Hunzhou	TGT GTC TGC GA				
CqH1	--- --- --- --	CH 6	--- --- --- --	Yunnan1	--- --- --- --
CqH2	--- --T --T --	CH 7	-A- --- --T --	Yunnan2	--- --- -A- --
CqH3	--- --T --- --	CH 8	--- --- --- --	Tibet	--- --- --- --
CqH4	-A- --- --- -G	CH 9	--- A-- --- --	Jilin1	--- --- --T --
CqH5	--- --T A-T --	CH 10	-A- --- -A- --	Gansu2	--- --- --- --
CqH6	--- --- A-- --	CH 11	--- --- --- --	Shanxi2	--- --- --- --
CqH7	--C --T A-- --	CH 12	-A- A-- --- --	Yunnan3	--- --- --- --
CqH8	--- --- A-T --	CH 13	-A- --- --- --	Hainan	--- --- --- --
CqH9	--- --- --- A-	CH 14	-A- --- --- --	Jilin2	--- --- --- --
CqH10	--- --- AA- --	CH 15	--- --- --- --	Guangdong	--- --- --- --
CqH11	--- --A --- --	CH 16	-A- --- --- --	Cambodia1	--- A-- --- A-
CqH12	--- A-- --- --	CH 17	--- --- --- --	Cambodia2	-A- --- --- --
CqH13	C-- -C- --- --	CH 18	--- --- --- --	Vietnam3	--- C-- --- --
CqH14	--- --- --T --	CH 19	--- A-- --- --	Vietnam2	--- --- --- --
CqH15	--- --- -A- A-	Gansu	--- --- --- --	Vietnam1	--- --- --- --
CqH16	-A- --- --- --	Shanxi	-A- --- --- --	Laos1	--- --- --- --
CqH17	--- --- --- --	Sichuan	--- --- -A- --	ThaiS1	--- --T --- A-
Cqnc_H1	--- --- --- --	Henan	--- --- --- --	ThaiN3	--- --- --- --
Cqnc_H2	--- --- --- --	Nepal1	--- --- --- --	ThaiN2	--- --- --- --
Cqnc_H3	--- --- --- A-	Nepal2	--- --- --- --	India H1	--- --A --- --
Cqnc_H4	--- A-- --- A-	Nepal3	--- A-- -A- --	India H3	--- --T A-T --
CH 1	--- --- --T --	Nepal4	--- --- --- --	India H2	--- --A --- A-
CH 2	--- --- --T --	Qinghai	--- A-- --- --	Japan	--- --- --- --
CH 3	--- --- --T --	Sichuan1	--- --- --- --	IndiaP2	-A- A-T -TA TT
CH 4	--- --- --T --	Sichuan2	--- --- --- --	IndiaP1	-A- A-T -TA TT
CH 5	--- --- --- --	Sichuan3	--- --- --- --		

图 4　东方蜜蜂不同种群间 mtDNA 非编码区单倍型序列对比分析

Fig. 4　Alignment of haplotypes of mtDNA non-coding region in *Apis cerana* populations

CqH1 – CqH17 代表本研究所测定获得的 17 个单倍型，红色标记表示新发现的单倍型。短横线代表相同序列。CqH1 – CqH17 are the symbols of seventeen haplotypes sequenced in this study. Symbols marked with red represent the haplotypes not ever identified. The short lines mean the common nucleic acids.

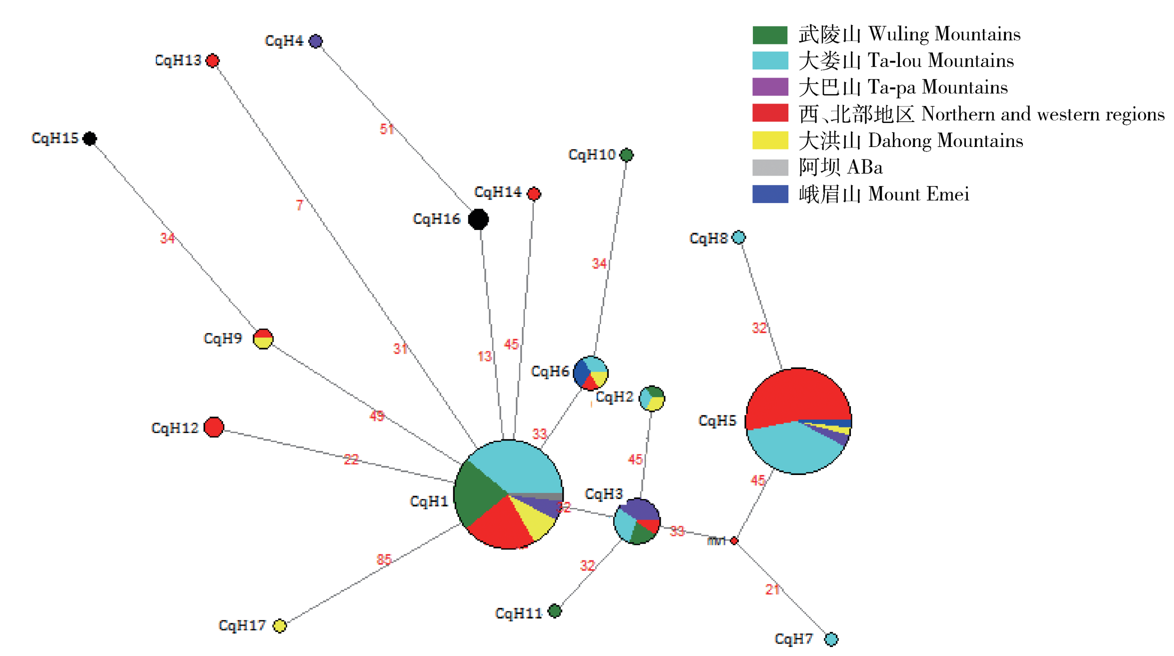


图 5　鉴定获得的重庆中华蜜蜂不同种群 mtDNA 非编码区单倍型网络中介分析

Fig. 5　The median-joining networks with the haplotypes of mtDNA non-coding region from *Apis cerana cerana* populations in Chongqing

图中每个圆圈代表一种单倍型，其面积大小与该种单倍型出现的频率成正比。红色数字代表两两单倍型间的变异位点。Each circle represents one haplotype and its area stands for the frequency of haplotype occurrence. The numbers marked with red denote the site of mutation between two haplotypes.

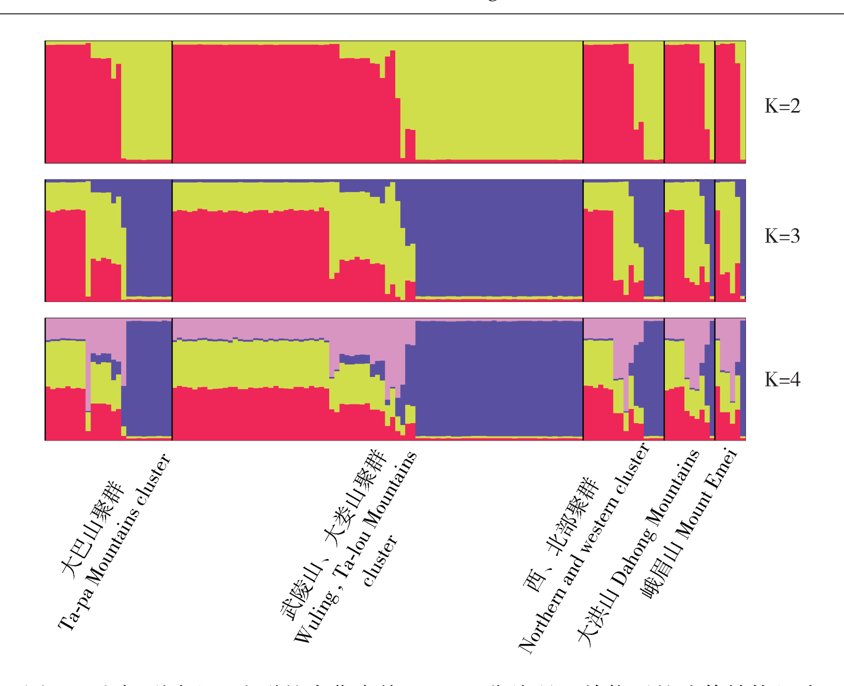


图 6 重庆不同地理聚群的中华蜜蜂 mtDNA 非编码区单倍型的遗传结构组成

Fig. 6 The genetic structure of haplotypes of mtDNA non-coding region based on morphological cluster of *Apis cerana cerana* populations in Chongqing

K 代表种群数量。K represents the number of populations.

眉山的中华蜜蜂种群虽然在形态上有差别,但遗传结构组成相似。这一结果暗示了基因交流广泛发生在不同地理分布的中华蜜蜂之间,使得遗传分化与地理分布差异性乃至形态多样性之间的关联性非常小。

3 讨论

蜜蜂是重要的经济性授粉昆虫,研究中华蜜蜂形态和遗传分化可以了解我国不同地区的蜂种资源,为中蜂的生态资源保护提供指导。本研究采集了重庆不同生境 122 群中华蜜蜂样本,测量和分析了 6 项形态指标,并与大洪山(湖北荆门),马尔康(四川阿坝)、峨眉山(四川乐山)的 17 群中华蜜蜂形态指标进行比较。结果显示重庆不同山脉和地区的中华蜜蜂吻长、翅长、翅宽以及第 3 和 4 背板之和整体有别于大洪山、峨眉山中华蜜蜂。由于重庆地形复杂,海拔落差较大,形态上的差异应该与生境适应相关(曾志将, 1992; Hepburn *et al*., 2000; 余林生等, 2010)。直接聚类和主成分聚类均显示重庆中蜂与大洪山中蜂明显分化为两大类,这暗示着重庆的中华蜜蜂可能与华中型中蜂在形态上有区别。本研究所获得的重庆中蜂 3 个形态聚群中,大巴山为北亚热带山地气候,其他地区均为亚热带季风气候,气候类型和所处山脉的不同使中华蜜蜂形态产生分化,这与前人的研究结果相一致(余林生等, 2008)。

蜜蜂具有独特的婚飞繁殖方式,工蜂的 mtDNA 能反映蜂群的遗传结构,因此 mtDNA 标记是研究蜜蜂遗传多样性的依据(Crozier and Crozier, 1993)。不同地理种群中蜂 mtDNA 存在差异(刘振国等, 2015);本研究发现,同一地点的不同样本其 mtDNA 序列也存在差异,如大巴山脉的城口就有 4 个单倍型。本研究鉴定了 17 个单倍型,对比发现有 3 个新的单倍型,分别来自大巴山脉(城口)、大娄山脉(南川金佛山)、西部丘陵(合川),这表明中华蜜蜂在重庆复杂地形下种群遗传资源丰富,具有很大的保种价值。重庆不同山脉和地区的中华蜜蜂之间 mtDNA 遗传结构类似,与大洪山和峨眉山的中华蜜蜂也相类似。可见,地理环境造成的生境条件差异并不是影响中华蜜蜂种群间分子亲缘关系的决定因素。不同生境条件下蜜蜂种群之间的基因交流会影响中华蜜蜂的遗传分化(Bertrand *et al*., 2015, 郭慧萍等, 2016),这是导致重庆中蜂不同地理种群之间遗传结构差异性不明显的原因之一。此外,形态分化受多因素影响,如核基因的转录水平差异、DNA 表观遗传调控等,而 mtDNA 是母系遗传分子,主要反映系统遗传分化。因此,重庆中华蜜蜂不同地理种群的形态变化与 mtDNA 遗传分化的关联性不明显。

参考文献（References）

Bandelt HJ, Forster P, Röhl A, 1999. Median-Joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol. Biol. Evol.*, 16(1): 37－48.

Bertrand B, Alburaki M, Legout H, Moulin S, Mougel F, Garnery L, 2015. MtDNA COI-COII marker and drone congregation area: an efficient method to establish and monitor honeybee (*Apis mellifera* L.) conservation centres. *Mol. Ecol. Resour.*, 15(3): 673－683.

Brannelly LA, Hunter DA, Skerratt1 LF, Scheele BC, Lenger D, McFadden MS, Harlow PS, Berger L, 2015. Chytrid infection and post-release fitness in the reintroduction of an endangered alpine tree frog. *Anim. Conserv.*, 19(2): 1－10.

Bu Y, Zheng ZM, 2005. Roles and status of cytochrome oxidase II gene in the research of insect molecular systematics. *Chinese Bulletin of Entomology*, 42(1): 18－22.［卜云，郑哲民，2005. COⅡ基因在昆虫分子系统学研究中的作用和地位. 昆虫知识，42(1): 18－22］

Cao LF, Ji CH, Ren Q, Cao L, Dai RG, Hu FL, 2010. Report on genetic diversity of *Apis cerana* in Jinfo Mountain of Chongqing. *Journal of Southwest China Normal University (Natural Science Edition)*, 35(5): 162－166.［曹联飞，姬聪慧，任勤，曹兰，戴荣国，胡福良，2010. 重庆金佛山地区东方蜜蜂遗传多样性研究. 西南师范大学学报(自然科学版)，35(5): 162－166］

Chambers J, 2008. Software for Data Analysis: Programming with R. Springer-Verlag, London. 237－280.

Chen SL, 2001. The Apicultural Science in China. China Agriculture Press, Beijing. 1－16.［陈盛禄，2001. 中国蜜蜂学. 北京：中国农业出版社. 1－16］

Crozier RH, Crozier YC, 1993. The mitochondrial genome of the honeybee *Apis mellifera*: complete sequence and genome organization. *Genetics*, 133(1): 97－117.

Excoffier L, Lischer HL, 2010. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol. Ecol. Resour.*, 10(3): 564－567.

Frank P, Garnery L, Solignac M, Cornuet JM, 2000. Molecular confirmation of a fourth lineage in honeybees from the Near East. *Apidologie*, 31(2): 167－180.

Garnery L, Cornuet JM, Solignac M, 1992. Evolutionary history of the honeybee *Apis mellifera* inferred from mitochondrial DNA analysis. *Mol. Ecol. Notes*, 1(3): 145－154.

Garnery L, Solignac M, Celebrano G, Cornuet JM, 1993. A simple test using restricted PCR-amplied mitochondrial DNA to study the genetic structure of *Apis mellifera* L. *Experientia*, 49(11): 1016－1021.

Guo HP, Zhou SJ, Zhu XJ, Xu XJ, Yu YL, Yang KJ, Chen DY, Zhou BF, 2016. Population genetic analysis of *Apis cerena* from the Qinling-Daba Mountain Areas based on microsatellite DNA. *Acta Entomologica Sinica*, 59(3): 337－345.［郭慧萍，周姝婧，朱翔杰，徐新建，于瀛龙，杨凯杰，陈道印，周冰峰，2016. 秦巴山区中华蜜蜂种群微卫星 DNA 遗传分析. 昆虫学报，59(3): 337－345］

Hepburn HR, Radloff S, Oghiakhe S, 2000. Mountain honeybees of Africa. *Apidologie*, 31(2): 205－221.

Jiang YS, Zhao HT, Jiang JB, Cao GQ, Zhang GX, Zhu WJ, Guo CJ, 2007. Studies on mtDNA $tRNA^{leu}$-COⅡ gene polymorphisms of *Apis cerana* distributed in different geographic areas in China. *Scientia Agricultura Sinica*, 40(7): 1535－1542.［姜玉锁，赵慧婷，姜俊兵，曹果清，张桂贤，朱文进，郭传甲，2007. 中国境内不同地理型东方蜜蜂遗线粒体 DNA $tRNA^{leu}$～COⅡ基因多态性研究. 中国农业科学，40(7): 1535－1542］

Li ZY, Wang Z, 2004. The discussion about honeybee morphological identification technology. *Apiculture of China*, 55(4): 13.［李志勇，王志，2004. 关于蜜蜂形态鉴定技术的探讨. 中国蜂业，55(4): 13］

Librado P, Rozas J, 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25(11): 1451－1452.

Liu ZG, Ji T, Shen F, Liang Q, Luo YX, 2015. Genetic diversity of geographic populations of *Apis cerana cerana* estimated by mitochondrial *CO* Ⅱ gene sequences. *Journal of Environmental Entomology*, 37(3): 567－575.［刘振国，吉挺，沈芳，梁勤，罗岳雄，2015. 基于线粒体 *CO*Ⅱ基因序列的中华蜜蜂地理种群的遗传多样性研究. 环境昆虫学报，37(3): 567－575］

Luo LJ, Tan K, 2009. A study of morphology of Sichuan *A. cerana*. *Journal of Bee*, 12(9): 3－4.［罗凌娟，谭垦，2009. 四川省东方蜜蜂的形态学研究. 蜜蜂杂志，12(9): 3－4］

Magnus RM, Tripodi AD, Szalanski AL, 2014. Mitochondrial DNA diversity of honey bees (*Apis mellifera*) from unmanaged colonies and swarms in the United States. *Biochem. Genet.*, 52(5－6): 245－257.

Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P, 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155(2): 945－959.

Ren Q, Dai GR, Ji CH, 2012. The comparative advantage and development strategy of Chongqing bee industry. *Apiculture of China*, 63(7): 35－37.［任勤，戴荣国，姬聪慧，2012. 重庆蜜蜂产业的比较优势及发展战略. 中国蜂业，63(7): 35－37］

Ruttner F, 1988. Biogeography and Taxonomy of Honeybees. Springer-Verlag, Berlin. 120－161.

Ruttner F, Tassenocourt L, Louvaux J, 1978. Biometrical-statistical analysis of the geographic variability of *Apis mellifera* L. *Apidologie*, 9(4): 363－381.

Sharmah D, Khound A, Rahman S, Rajkumari P, 2015. Significance of honey bee as a pollinator in improving horticultural crop productivity in N.E. region, India: a review. *Asian J. Nat. Appl. Sci.*, 4(1): 62－69.

Smith D, Villafuture L, Otis G, Palmer M, 2000. Biogeography of *Apis cerana* F. and *A. nigrocincta* Smith: insights from mtDNA studies. *Apidologie*, 31(2): 265－279.

Smith DR, Brown WM, 1988. Polymorphism in mitochondrial DNA of European and Africanized honeybee (*Apis mellifera*). *Experientia*, 44(3): 257－260.

Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S, 2013.

MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol. Biol. Evol.*, 30(12): 2725-2729.

Tan HW, Zhang J, Wang YK, 2014. The situation of the development of Apiculture and suggestion in Chongqing City. *Apiculture of China*, 65(12): 74-79. [谭宏伟, 张晶, 王永康, 2014. 重庆市蜜蜂产业发展现状及建议. 中国蜂业, 65(12): 74-79]

Tan K, Zhang X, He SY, Zhou DY, 2005. Morphology and biogeography of *Apis cerana* (Fabr.) in the China. *Journal of Yunnan Agricultural University*, 20(3): 410-414. [谭垦, 张炫, 和绍禹, 周丹银, 2005. 中国东方蜜蜂的形态学及生物地理学研究. 云南农业大学学报, 20(3): 410-414]

The National Livestock or Poultry Genetic Resource Committee, 2011. China Livestock and Poultry Genetic Resource-Bees. China Agriculture Press, Beijing. 40-65. [国家畜禽遗传资源委员会, 2011. 中国畜禽遗传资源志(蜜蜂志). 北京: 中国农业出版社. 40-65]

Tian LQ, Wang Q, Chao FH, Zeng ZJ, 2013. Morphometric characters of *Apis cerana cerana* of Yifeng County in Jiangxi Province. *Journal of Bee*, 12(5): 15-16. [田柳青, 王齐, 巢福海, 曾志将, 2013. 江西宜丰县中华蜜蜂的形态特征. 蜜蜂杂志, 12(5): 15-16]

Wang GZ, Shi W, 2008a. A study on morphoclusters of Shanxi *A. cerana*. *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis*, 30(3): 411-417. [王桂芝, 石巍, 2008a. 山西东方蜜蜂形态类群的研究. 江西农业大学学报, 30(3): 411-417]

Wang GZ, Shi W, 2008b. Researches on diversity of morphometric characters about Henan *Apis cerana*. *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis*, 30(6): 989-996. [王桂芝, 石巍, 2008b. 河南东方蜜蜂形态多样性研究. 江西农业大学学报, 30(6): 989-996]

Yang GH, 2009. The role of *Apis cerana cerana* in forest ecosystem in China. *Apiculture of China*, 60(4): 5-10. [杨冠煌, 2009. 中华蜜蜂在我国森林生态系统中的作用. 中国蜂业, 60(4): 5-10]

Yu LS, Xie WF, Wu HC, Zou YD, Nan QY, Zhu LC, Ji H, Wu QC, 2012. Morphological characteristics and microsatellite DNA genetic diversity of Nigeria African honey bee, Anhui *Apis mellifera* and theirs hybrid generation Ⅱ. *Acta Ecologica Sinica*, 32(11): 3555-3564. [余林生, 解文飞, 巫厚长, 邹运鼎, 南茎耀, 朱林才, 纪鸿, 吴其才, 2012. 尼日利亚非洲蜂和安徽意大利蜜蜂及其杂交二代形态特征与微卫星 DNA 遗传多样性. 生态学报, 32(11): 3555-3564]

Yu LS, Zhang XF, Wu CW, Zou YD, Wu CH, Li X, Cao YF, Xie WF, Zhou GY, Ji XG, 2010. Diversity of morphological characters of *Apis cerana cerana* in the different ecological conditions of South Anhui Mountainous. *Acta Ecologica Sinica*, 30(4): 984-988. [余林生, 张学锋, 吴承武, 邹运鼎, 邬春华, 李欣, 曹义锋, 解文飞, 周观跃, 纪旭光, 2010. 皖南山区不同生态条件下中华蜜蜂形态特征差异性. 生态学报, 30(4): 984-988]

Yu LS, Zou YD, Cao YF, Bi SD, Wu HC, Ding J, Xie WF, 2008. Comparative study on the niches of *Apis mellifera ligustica* and *Apis cerana cerana*. *Acta Ecologica Sinica*, 28(9): 4575-4581. [余林生, 邹运鼎, 曹义锋, 毕守东, 巫厚长, 丁建, 解文飞, 2008. 意大利蜜蜂(*Apis mellifera ligustica*)与中华蜜蜂(*Apis cerana cerana*)生态位的比较. 生态学报, 28(9): 4575-4581]

Yu ZY, Liu YQ, Zhou DY, Zhao WZ, Dai GR, He SY, Miao YW, 2012. Genetic diversity of *Apis cerana* in Chongqing using mtDNA Cytochrome *b* gene sequences. *Journal of Bee*, 12(11): 1-3. [于增源, 刘意秋, 周丹银, 赵文正, 戴荣国, 和绍禹, 苗永旺, 2012. 利用线粒体 Cyt *b* 为遗传标记分析重庆地区东方蜜蜂的遗传多样性. 蜜蜂杂志, 12(11): 1-3]

Zeng ZJ, 1992. Analysis of correlative degree between morphological characters of worker bees and quantity of collect honey. *Apicul. China*, 1(3): 12, 23. [曾志将, 1992. 工蜂形态指标与产蜜量的关联度分析. 中国养蜂, 1(3): 12, 23]

Zhang LJ, Fan X, Tan K, He SY, 2006. Morphometric study of *Apis cerana* in Changbai Mountain. *Journal of Yunnan Agricultural University*, 21(4): 511-516. [张连江, 樊贤, 谭垦, 和绍禹, 2006. 长白山东方蜜蜂形态特征研究. 云南农业大学学报, 21(4): 511-516]

Zhu XJ, Zhou BF, Wu XD, Xu XJ, Wang Q, 2009. Morphometric genetic analysis: population differentiation of *Apis cerana cerana* in Damen Island. *Apiculture of China*, 60(1): 5-7. [朱翔杰, 周冰峰, 吴显达, 徐新建, 王青, 2009. 大门岛中华蜜蜂种群分化形态遗传分析. 中国蜂业, 60(1): 5-7]

(责任编辑: 马丽萍)